

PCT/EP 0 3 / 0 8 8 0 6



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

REC'D 22 SEP 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02019570.7

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Anmeldung Nr:  
Application no.: 02019570.7  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 02.09.02  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

MERCK PATENT GmbH  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verfahren zur Extraktion von Proteinen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C12P21/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

2002 EM02166P RR.doc1/48

**Merck Patent Gesellschaft  
mit beschränkter Haftung  
64271 Darmstadt**

## **Verfahren zur Extraktion von Proteinen**

- 1 -

## Verfahren zur Extraktion von Proteinen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Extraktion zellulärer Proteine in Abhängigkeit ihrer subzellulären Lokalisierung (Topologie). Insbesondere ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren bei der Aufteilung des Gesamtproteoms in Partialproteome die Isolierung von Proteinen des Zellkerninneren als eigenständige Fraktion und macht diese Fraktion damit erstmals in ausreichender Reinheit und Qualität für weitere Analysen zugänglich.

10 Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms erhält die Wissenschaft  
Zugang zum individuellen genetischen Code eines jeden Menschen.  
Daraus ergeben sich Informationen über seine Abstammung und Herkunft.  
Für die Untersuchung der biologischen Funktion einzelner Gene bzw. der  
15 entsprechenden Proteine ist diese Information aber nicht ausreichend. Das  
komplexe Netzwerk einer Zelle läßt sich nicht einfach durch das  
Entschlüsseln der genomischen DNA eines Menschen charakterisieren.  
Eine Untersuchung der Proteine, die vom Genom kodiert werden, muss  
sich der Genomanalyse anschließen, da nur mit dieser Zusatzinformation  
20 das dynamische Geschehen des menschlichen Organismus auf  
molekularer Ebene beschreibbar ist. Auch gibt es oftmals nur eine geringe  
Korrelation zwischen der Gen-Transkription und dem entsprechenden  
Translationsprodukt, so daß nur mit Hilfe der Proteomanalyse erkennbar  
wird, welche Proteine unter gegebenen Einflüssen wie stark exprimiert und  
25 eventuell posttranslational verändert werden (Allen, L.: Functional  
Genomics *Nature* 405 (2000) 819-865; Ezzell, C.: The Business of the  
Human Genome *Scientific American* July (2000) 39-57).

30 Um Proteine z.B. bezüglich ihres Expressionsmusters oder ihrer Funktion  
untersuchen zu können, müssen diese zuerst für die entsprechenden  
Analysen zugänglich gemacht werden.

- 2 -

Die parallele Auftrennung und Analyse aller Proteine einer Zelle ist mit den heutigen Methoden nahezu unmöglich. Eine humane Zelle exprimiert zwischen 35.000 und 50.000 Proteine, die mit einem Faktor  $10^6$  in der Abundanz variieren. Auch mit der momentan höchst auflösenden Protein-  
5 Trenntechnik, der 2 dimensional gelelektrophorese, lassen sich maximal 5.000 bis 10.000 Proteine mit hoher Auflösung separieren, wobei aus einem Gesamtlisat hauptsächlich die Proteine mit hoher Expressionsrate visualisiert werden können. Da aber in den meisten Fällen eher niedrig-abundante Proteine in pathologischen Prozessen involviert sind, ist unter  
10 klinischen und diagnostischen Gesichtspunkten vor der Proteinanalyse eine Fraktionierung der Proteine einer Zelle in Untereinheiten, also die Herstellung von Partialproteomen, erforderlich.

Zur Klärung der Funktion eines Proteins sind verschiedene Basistechniken  
15 wie z.B. Aktivitäts-Assays oder Proteinwechselwirkungsuntersuchungen entwickelt worden. Diese setzen allerdings zumeist voraus, dass die zu untersuchenden Proteinen der jeweiligen Funktionsanalyse in nativem, nicht denaturierten Zustand zugeführt werden.

Ein wertvoller ergänzender Ansatz zur Untersuchung der Funktion von  
20 Proteinen ist die Analyse der subzellulären Lokalisierung von Proteinen oder deren Umverteilung in einer Zelle. Viele Regelungsvorgänge in einer Zelle führen nach Wechselwirkung mit einem Signalmolekül zur Änderung der subzelluläre Lokalisierung, wobei z.B. durch Übergang eines Proteins  
25 vom Cytosol in den Zellkern eine Änderungen der RNA-Transkription hervorgerufen wird.

Somit steigt die Nachfrage nach standardisierten Verfahren zur Herstellung von Partialproteomen, welche zum einen eine Reduktion der Gesamtzahl  
30 der parallel zu untersuchenden Proteine bewirken und es zum anderen erlauben, die subzelluläre Lokalisierung (Topologie) als zusätzliche Information in die funktionelle Proteomanalyse einzubeziehen.

- 3 -

Es sind verschiedene Methoden zur Herstellung von Partialproteomen bekannt, die jedoch durch die Art der Aufreinigung jeweils nur einen Teil des Proteoms für die Analyse zugänglich machen. Beispiele derartiger Methoden sind die Aufreinigung vereinzelter Zellkompartimente basierend entweder auf unterschiedlicher Netto-Ladung oder unterschiedlicher Dichte der Kompartimente, auf unterschiedlicher Proteinzusammensetzung, die für Affinitätsaufreinigung genutzt werden kann, oder auf unterschiedlicher Löslichkeit der Organellproteine in Gegenwart von speziellen Puffern.

Da bei diesen Verfahren nur ein Teil des Gesamtproteoms einer Zelle für die Analyse zugänglich gemacht wird, sind Proteine, die nicht in dem jeweiligen aufgereinigten Partialproteom enthalten sind, der weiteren Analyse nicht zugänglich. Zudem ist die Untersuchung einer topologischen Umverteilung von Proteinen nicht möglich. Das vorherige Aufteilen des Probenkollektivs und die parallele Herstellung verschiedener Teilproteome kann die oben genannten Nachteile nur bedingt beseitigen, da diese Variante zum einen sehr arbeitsaufwendig ist und zum anderen die Gefahr birgt, dass die Proben nicht homogen sind. Zudem ist die zur Verfügung stehende Probenmenge häufig so gering, dass eine Aufteilung der Probe unmöglich ist.

Wünschenswert wäre daher eine Methode, die es ermöglicht, die gesamte Probe in einem sequentiellen Verfahren in verschiedene Partialproteome aufzutrennen, wobei alle Proteine der Probe schlußendlich als Bestandteil eines der Partialproteome weiteren Analysen zugänglich sind.

Eine bekannte Methode zur sequentiellen Aufreinigung mehrerer Zellkompartimente ist die selektive Detergenz-Extraktion [1, 2], wobei vier Fraktionen (Partialproteome) erhalten werden. Im ersten Schritt wird eine cytosolische Fraktion erhalten, in der die löslichen Proteine des Cytosols und löslichen Komponenten des Cytoskeletts angereichert sind. Im zweiten

- 4 -

Schritt erhält man eine Fraktion mit Proteinen der Membranen/Organeln.  
Der dritte Schritt ergibt eine 'nukleäre' Fraktion, in der nach Angaben der  
Autoren Proteine der Kernmembran sowie lösliche nukleäre Proteine  
angereichert sein sollen. Im vierten und letzten Schritt entsteht eine  
5 Fraktion mit Proteinen des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der  
Kernmatrix.

Seit dem Publikationsdatum der ursprünglichen Methode im Jahre 1994  
wurden verschiedene Modifikationen eingeführt, die sich alle ausschließlich  
10 auf den finalen Extraktionsschritt nach Solubilisierung des Zellkerns  
konzentrierten (zusammengefasst in Patton, 1999 [3]). Die beschriebene  
Methode wurde für die Untersuchung der subzellulären Redistribution eines  
Transkriptionsfaktors eingesetzt [4], welcher an der Signaltransduktion  
durch Cytokine beteiligt ist und nach der cytokin-induzierten Translokation  
15 in den Nukleus direkt an die DNA binden kann [5, 6, 7]. Nach den  
Ergebnissen der Autoren wurden jedoch insbesondere lösliche und/oder  
DNA-assoziierte Zellkern-Proteine gemeinsam mit Proteinen des  
Cytoskeletts und der nukleären Matrix erst im letzten und denaturierenden  
Extraktionsschritt erhalten.

20 Dies bedeutet, dass nach den bisher bekannten Methoden für die  
sequentielle Aufreinigung mehrerer Zellkompartimente durch selektive  
Detergenz-Extraktion [1, 2, 3] keine eindeutige topologische Zuordnung  
nukleärer Proteine möglich ist, da keine eigenständige, von Komponenten  
25 des Cytoskeletts getrennte Fraktion erhalten wird, die insbesondere die  
Proteine des Zellkerninneren enthält.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Extraktionsmethode ist, dass auch die  
Transkriptionsfaktoren in der vierten Fraktion enthalten sind. Da  
30 Transkriptionsfaktoren in einer wesentlich geringeren Anzahl vorkommen  
als Cytoskelettproteine, wird ihre Detektion und Analyse durch die  
Anwesenheit der Cytoskelettproteine deutlich erschwert.

- 5 -

- 5 Zudem ist die nachfolgende funktionelle Analyse der in der vierten Fraktion enthaltenen Proteine stark eingeschränkt, weil bei der Gewinnung dieser Fraktion Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt wird. Dadurch werden die Proteine denaturiert und sind daher wichtigen Analyseverfahren, wie z.B. Co-Immunopräzipitation oder *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), nicht mehr zugänglich. Auch dies ist ein entscheidendes Hindernis für eine nachfolgende funktionelle Analyse dieser wichtigen regulatorischen Proteinklasse.
- 10 In keiner der seit 1994 vorgenommenen Anwendungen oder auch Veränderungen des Extraktionsprotokolls wurden diese Probleme erkannt, geschweige denn diesbezügliche Verbesserungen vorgeschlagen.
- 15 In eukaryontischen Zellen sind aber gerade die Proteine des Zellkerns von großer Bedeutung für verschiedenste Funktionen der Zelle. Der Zellkern macht etwa 10% des gesamten Volumens einer eukaryontischen Zelle aus und ist umgeben von einer nuklearen Hülle, welche aus zwei Membranen besteht. Die nukleare Hülle ist direkt mit dem Endoplasmatischen
- 20 Reticulum verbunden und ist eingefangen in zwei Netzwerken aus intermediären Filamenten: einer dünnen Schicht von Filamenten (nukleare Lamina) im Inneren des Zellkerns, die die innere Zellmembran stützt, und weniger regelmäßig organisierten intermediären Filamenten, welche die äußere nukleare Membran umgeben. Diese intermediären Filament-
- 25 Netzwerke geben der Kernhülle somit eine gewisse Stabilität. Umgeben von der Kernhülle ist das Nukleoplasma, welches u.a. Chromatin (DNA und daran assoziierte Proteine) und den Nukleolus enthält. Zu den Kernproteinen im Nukleoplasma, d.h. im Inneren des Zellkerns, gehören insbesondere DNA-bindende Proteine wie Histone sowie
- 30 Nichthistonproteine (z.B. HMGs und Transkriptionsfaktoren), RNA-bindende Proteine, die beim RNA-Splicing und -Transport involviert sind, oder auch Skelett-assoziierte Proteine. Die Proteine, die das Skelett im



- 8 -

Inneren des Zellkerns, insbesondere die Lamina, bilden, werden bei dieser Betrachtung nicht als Teil des Nukleoplasmas bzw. des Zellkerninneren angesehen. Im folgenden werden daher als Proteine des Zellkerninneren insbesondere DNA-bindende Proteine wie Histone sowie

5 Nichthistonproteine (z.B. HMGs und Transkriptionsfaktoren), RNA-bindende Proteine, die beim RNA-Splicing und -Transport involviert sind, oder auch Skelett-assoziierte Proteine angesehen.

Verschiedene Methoden zur vereinzelt Solubilisierung von

10 Zellkernproteinen sind in der Literatur beschrieben, u. a. durch Einsatz von hohen Salzkonzentrationen ( $\geq 1M$ ), wobei bekannt ist, dass hohe Salzkonzentrationen im Extraktionspuffer die Proteinwechselwirkungen und somit die weiteren funktionellen Analysen, wie z.B. die Analyse von Proteinkomplexen stören. Zusätzlich werden durch hohe

15 Salzkonzentrationen in den extrahierten Fraktionen alle nachfolgenden proteinanalytischen Methoden wie z.B. Isoelektrische Fokussierung (IEF), Enzymaktivitätstests, EMSA, ELISA, SDS-PAGE und 2DE beeinträchtigt. Weiterhin werden durch hohe Salzkonzentrationen leicht Cytoskelett- und Cytoskelettassoziierte Proteine angegriffen, was zu einer Verunreinigung

20 der Fraktion der Zellkernproteine mit Cytoskelett-Proteinen bewirken kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, das im Zuge der sequentiellen Aufteilung des Gesamtproteoms in Partialproteome neben weiteren Partialproteomen auch

25 die Erzeugung eines Partialproteoms der Proteine des Zellkerninneren ermöglicht, ohne die Proteine des Zellkerninneren dabei wesentlich zu denaturieren.

Es wurde gefunden, dass bei der Erstellung von Partialproteomen aus dem

30 Gesamtproteom einer Zellpräparation, aus der nach Abtrennung der cytosolischen Proteine und der Proteine der Membranen/Organelle unter anderem erhaltenen Zellkernpräparation die Freisetzung der Proteine des

- 7 -

Zellkerninneren effizient und überraschend einfach bewirkt wird, ohne dabei die Integrität des Cytoskeletts signifikant zu beeinträchtigen, wenn die Zellkernpräparation mit einer erfindungsgemäßen Salz- und Detergenzlösung sowie bevorzugt zusätzlich mit einer Nuklease extrahiert wird.

Da bei der Erstellung Partialproteoms der Proteine des Zellkerninneren die Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der nukleären Matrix nicht in wesentlichem Umfang mit extrahiert werden, können diese in einem nachfolgenden sequentiellen Verfahrensschritt als eigenständige Fraktion erhalten werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur sequentiellen Herstellung von Partialproteomen aus dem Gesamtproteom einer Zellpräparation, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellen einer Probe enthaltend eine Zellpräparation
- b) Extraktion der cytosolischen Proteine und der Membran/Organelle-Proteine aus der in Schritt a) bereitgestellten Probe, wobei eine Zellkernpräparation zurückbleibt.
- c) Extraktion der Proteine des Zellkerninneren aus der in Schritt b) erhaltenen Zellkernpräparation durch Behandlung mit einem Extraktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8, der zumindest die folgenden Bestandteile enthält:
  - insgesamt 0,1 bis 7 Massenprozent eines oder mehrerer nicht ionischer Detergentien
  - insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent eines oder mehrerer Cholsäurederivate
  - eines oder mehrere Salze aus der Gruppe der Alkalimetall- und/oder Ammoniumsalze in einer Gesamtkonzentration zwischen 75 und 500 mMol/l,wobei Detergenz-resistente Proteine des Cytoskeletts und der Kernmatrix nicht in wesentlichem Umfang zusammen mit den Proteinen des Zellkerninneren extrahiert werden, sondern im

- 8 -

Extraktionsrückstand verbleiben. Man erhält in Schritt c) als Extrakt demnach ein an Proteinen des Zellkerninneren angereichertes Partialproteom.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der in Schritt c) eingesetzte Extraktionspuffer zusätzlich eine Nuklease.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der in Schritt c) eingesetzte Extraktionspuffer Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat (Tween® 40) als nicht-ionisches Detergenz, Deoxycholat als Cholsäurederivat und NaCl als Alkalimetallsalz.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Extraktion der cytosolischen Proteine und der Membran/Organellen-Proteine in Schritt b) durch:

- i) Extraktion der cytosolischen Proteine aus der in Schritt a) bereitgestellten Probe durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran, ohne dabei die Integrität der subzellulären Membran/Organell Strukturen, des Zellkerns sowie des Cytoskeletts signifikant zu beeinträchtigen. Man erhält als Extrakt ein an cytosolischen Proteinen angereichertes Partialproteom;
- 20 ii) Extraktion der Membran/Organellen-Proteine aus dem in Schritt ii) nach der Extraktion verbliebenen Teil der Probe unter Erhaltung der strukturellen Integrität von Zellkern und Cytoskelett. Man erhält als Extrakt ein an Membran/Organellen-Proteinen angereichertens Partialproteom.
- 25

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden in einem zusätzlichen Verfahrensschritt d) aus dem in Schritt c) verbliebenen Extraktionsrückstand die Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der Kernmatrix als weiteres Partial-Proteom extrahiert.
- 30

- 9 -

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Untersuchung der Umverteilung von Proteinen oder der funktionellen Analyse von Proteinen

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit für die Proteinextraktion zumindest enthaltend einen Extraktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8, der zumindest die folgenden Bestandteile enthält:

- 10 - insgesamt 0,1 bis 7 Massenprozent eines oder mehrerer nicht ionischer Detergentien
- Insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent eines oder mehrerer Cholsäurederivate
- eines oder mehrere Salze aus der Gruppe der Ammonium- und/oder Alkalimetallsalze in einer Gesamtkonzentration zwischen 15 75 und 500 mMol/l.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit zusätzlich eine Nuklease, die dem Extraktionspuffer zugesetzt werden kann.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit zusätzlich Puffer zur Extraktion der cytosolischen Proteine und/oder der Membran/Organelle-Proteine aus Zellpräparaten sowie einen Puffer zur Extraktion der Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der Kernmatrix. Mit dieser bevorzugten Ausführungsform des Kits kann das erfindungsgemäße  
25 Verfahren zur Herstellung von vier Partialproteomen aus dem Gesamtproteom einer Zellpräparation durchgeführt werden.

Die Erläuterungen zu den Abbildungen 1 bis 8 finden sich in den Beispielen 1 bis 9.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht erstmals die Aufteilung des Gesamtproteoms einer Zellpräparation in mehrere Partialproteome, wobei

- 10 -

eines der Partialproteome angereichert ist an Proteinen des Zellkerninneren, so dass eine topologische Zuordnung und funktionelle Analyse möglich wird.

- 5 Partialproteom der Proteine des Zellkerninneren bedeutet erfindungsgemäß ein Partialproteom, in dem hauptsächlich Proteine des Zellkerninneren angereichert sind. Das erfindungsgemäße Partialproteom der Proteine des Zellkerninneren enthält keinen oder nur einen die weiteren funktionellen
- 10 Analysen nicht störenden geringen Anteil an Detergenz-resistenten Proteinen des Cytoskeletts und der nukleären Matrix. Weiterhin liegen die Proteine in dem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Partialproteom der Proteine des Zellkerninneren weitgehend nicht denaturiert vor. Das bedeutet, durch den erfindungsgemäß in Schritt c) eingesetzten Extraktionspuffer wird eine Denaturierung der Proteine so
- 15 weitgehend vermieden, dass ein ausreichender Anteil des in Schritt c) erhaltenen Partialproteoms der weiteren funktionellen Analyse zugeführt werden kann.

- 20 Als Zellpräparation können in dem erfindungsgemäßen Verfahren eukaryontische Zellen eingesetzt werden, beispielsweise in Suspension kultivierte Zellen oder adhärente Zellen. Genauso kann die Zellpräparation eukaryontische Zellen enthalten wie z.B. Spheroplasten aus Hefezellen, Pflanzenzellen nach Entfernung der Zellwand, Insektenzellen oder auch freigelegte Zellen aus Gewebe. Bevorzugt werden in dem
- 25 erfindungsgemäßen Verfahren als Zellpräparation eukaryontische Gewebekulturzellen eingesetzt.

- 30 Als Zellkernpräparation werden erfindungsgemäß Rückstände der Zellpräparation bezeichnet, aus denen zuvor die cytosolischen Proteine sowie die Membran/Organelle-Proteine entfernt wurden. Bei der Entfernung dieser Proteine muß natürlich sichergestellt werden, dass die in der resultierenden Zellkernpräparation enthaltenen Zellkerne noch soweit

- 11 -

intakt sind, dass die Proteine des Zellkerninneren noch überwiegend in der Zellkernpräparation vorliegen und nicht bereits bei der Entfernung der cytosolischen Proteine sowie die Membran/Organellen-Proteine entfernt wurden. Das wird beispielsweise durch die im folgenden für die Extraktion der cytosolischen Proteine sowie die Membran/Organellen-Proteine empfohlenen Puffersysteme gewährleistet. Weiterhin enthält eine Zellkernpräparation, die durch Entfernung der cytosolischen Proteine sowie der Membran/Organellen-Proteine aus Zellpräparationen hergestellt wurde, zumelst noch Bestandteile des Cytoskeletts.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Aufteilung des Gesamtproteoms der Zellpräparation in mindestens drei Partialproteome, von denen eines angereichert ist mit den Proteinen des Zellkerninneren. Neben dem Partialproteom der Proteine des Zellkerninneren können unterschiedliche weitere Partialproteome erzeugt werden. Die Art der weiteren Partialproteome ist abhängig von der Art der in Schritt b) durchgeführten Extraktion sowie der im Anschluß an die Extraktion des Partialproteoms der Proteine des Zellkerninneren (Schritt c)) vorgenommenen Extraktionsschritte.

Beispielsweise können die in Schritt b) extrahierten cytosolischen Proteine und Membran/Organellen-Proteine parallel in Form eines Partialproteoms extrahiert werden oder bevorzugt sequentiell, wobei zwei Partialproteome (ein Partialproteom angereichert mit cytosolischen Proteinen, ein Partialproteom angereichert mit Membran/Organellen-Proteinen) entstehen. „Angereichert“ bedeutet erfindungsgemäß, dass in dem jeweiligen Partialproteom vorwiegend die als „angereichert“ bezeichneten Proteine vorliegen. Andere Proteine sind nur in einer Menge vorhanden, die die weitere Analyse der angereicherten Proteine nicht wesentlich beeinträchtigt.

- 12 -

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird in Schritt b) zur Extraktion der cytosolischen Proteine die selektive Permeabilisierung der Plasmamembran der Zellen ohne signifikante Beeinträchtigung anderer zellulärer Substrukturen durch chemische Einwirkung mit einem Saponin, welches sich vorzugsweise in cholesterinreiche Membranen einlagert, insbesondere mit einem Digitonin-enthaltenden Puffer, bewirkt. Alternativ könnte dies auch mit anderen Substanzen wie z.B. Streptolysin-O, enzymatischer Einwirkung mittels z.B. Lipase oder auch Einwirkung mechanischer Kräfte mittels z.B. Elektroporation, Einfrieren/Auftauen, Filter-, „ripping“, oder deren Kombinationen bewirkt werden. Solche Verfahren sind in der Literatur beschrieben und der Fachmann bekannt. Man erhält als Extrakt ein an cytosolischen Proteinen angereichertes Partialproteom.
- 15 Nach der Extraktion der cytosolischen Proteine werden aus dem Extraktionsrückstand die Membran/Organelle-Proteine unter weitgehender Erhaltung der strukturellen Integrität von Zellkern und Cytoskelett extrahiert. Dafür eignen sich beispielsweise nicht-ionischen Detergentien oder zwitter-ionischen Detergentien unter milden Bedingungen. Insbesondere Triton® X-100 ist hierfür geeignet. Auch diese Verfahren sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt. Man erhält als Extrakt ein Partialproteom angereichert mit Membran/Organelle-Proteinen. Als Extraktionsrückstand erhält man eine Zellkernpräparation, die Verfahrensschritt c) zugeführt werden kann.
- 25 Sofern die Eigenschaften der Zellkernpräparation bezüglich der Erhaltung der strukturellen Integrität des Zellkerns bzw. der Zellkerne für Schritt c) nicht wesentlich verändert werden, kann in Schritt b) die Extraktion der cytosolischen und Membran/Organelle-Proteine auch mit anderen Mitteln durchgeführt werden. Weiterhin ist es möglich, Schritt b) auch in mehr als zwei Extraktionsschritten zur Erstellung von mehr als zwei Teilproteomen durchzuführen. Bevorzugt ist jedoch die Aufteilung in zwei Teilschritte zur
- 30

- 13 -

Erstellung eines Partialproteoms, das mit cytosolischen Proteinen angereichert ist, und eines Partialproteoms, das mit Membran/Organellen-Proteinen angereichert ist.

- 5 Um in Schritt b) nur ein Partialproteom zu erzeugen, das sowohl die cytosolischen wie auch die Membran/Organellen-Proteine enthält, ist es ausreichend die Zellpräparation aus Schritt a) mit Reagenzien zu behandeln, wie sie oben zur Extraktion der Membran/Organellen-Proteine beschrieben wurden, d.h. mit nicht-ionischen Detergentien oder zwitter-
- 10 ionischen Detergentien unter milden Bedingungen. Hierbei werden Detergentien mit einem HLB-Wert zwischen 12 und 20 für die nicht denaturierende Solubilisierung von Membranproteinen bevorzugt. Insbesondere Detergentien mit hoher Aggregatzahl, wie z. B. Triton® X-100 und NP-40, sind hierfür geeignet. Eine vorherige Behandlung zur selektiven
- 15 Extraktion von cytosolischen Proteinen (wie Behandlung mit einem Digitonin-enhaltenden Puffer oder mit Streptolysin-O, enzymatische Einwirkung mittels z.B. Lipase oder auch Einwirkung mechanischer Kräfte mittels z.B. Elektroporation, Einfrieren/Auftauen, Filter-„ripping“, oder deren Kombinationen) sind im allgemeinen nicht notwendig.

20 Die nach der Extraktion der cytosolischen Proteine und der Membran/Organellen-Proteine erhaltene Zellkernpräparation wird dann erfindungsgemäß Schritt c) zur selektiven Detergenzextraktion der Proteine des Zellkerninneren zugeführt.

25 Für das erfindungsgemäße Verfahren ist bei Schritt c), der Herstellung eines Partialproteoms, das mit den Proteinen des Zellkerninneren angereichert ist, von großer Bedeutung, dass die Proteine des Zellkerninneren größtenteils an Bindungspartner, wie Nukleinsäuren oder

30 andere Proteine, gebunden vorliegen. Die Stärke der Bindung, die die Proteine des Zellkerninneren mit ihren jeweiligen Bindungspartnern eingehen, ist sehr unterschiedlich und teilweise abhängig von dem



- 14 -

vorliegenden Milieu. So ist z.B. die Interaktion von Histonen mit DNA-Molekülen deutlich stärker als die von HMGs. In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Bindung der Proteine des Zellkerninneren an ihre Bindungspartner, insbesondere Nukleinsäuren, gezielt für eine weitere Selektion der Proteine des Zellkerninneren eingesetzt werden. Je nach Wahl des Extraktionspuffers können vermehrt leicht gebundene, stark gebundene Proteine des Zellkerninneren oder alle Proteine des Zellkerninneren nahezu unabhängig von ihrer Bindungsstärke an die jeweiligen Bindungspartner, insbesondere Nukleinsäuren, extrahiert werden.

Der in Schritt c) verwendete Extraktionspuffer weist typischerweise einen pH-Wert zwischen 6,5 und 8 auf. Bei niedrigeren pH-Werten können insbesondere Probleme mit der Löslichkeit bestimmter Bestandteile, wie der nicht-ionischen Detergenzien oder der Cholsäurederivate, auftreten. Der bevorzugte pH-Bereich liegt zwischen pH 6,9 und pH 7,8. Als Puffersubstanzen eignen sich daher solche, die im schwach sauren bis schwach alkalischen Bereich puffern, wie Mopso, Bes, Mops, Phosphat oder bevorzugt PIPES. Die Pufferkonzentration beträgt typischerweise zwischen 2-100 mM, bevorzugt zwischen 5 und 20 mM.

Weiterhin enthält der erfindungsgemäß verwendete Extraktionspuffer ein oder mehrere geeignete nicht-ionische Detergentien in einem Anteil von typischerweise insgesamt 0,1 bis 7 Massen%, auf jedem Fall oberhalb des CMCs, bevorzugt zwischen 0,2 und 5 Massen%. Eine Erhöhung der Detergenzkonzentration über den angegebenen Bereich hinaus birgt die Gefahr, dass eine vermehrte Denaturierung von Proteinen eintritt. Zudem können durch hohe Detergenzkonzentrationen die späteren Analyseverfahren gestört werden.

Wichtige Merkmale zur Unterscheidung von Detergentien sind beispielsweise der HLB-Wert und die Aggregatzahl.

- 15 -

Erfindungsgemäß geeignete nicht-ionische Detergentien sind solche, die in der erfindungsgemäß gewählten Konzentration in Kombination mit den anderen Bestandteilen des Extraktionspuffers bewirken, dass die bislang vorhandene Struktur des Zellkerns aufgelöst wird. Wichtig ist dabei, dass die vorher vorhandene Morphologie des Zellkerns zerstört wird und die Nukleoplasma-Proteine freigesetzt werden, ohne dass ein wesentlicher Anteil der Proteine des Cytoskeletts freigesetzt wird. Erfindungsgemäß besonders gut geeignete nicht-ionische Detergentien sind z. B. solche mit einer hydrophilen Polyoxyethylen Kopf-Gruppe, welche keinen Phenylring zwischen Alkylkette und Kopfgruppe besitzen, bevorzugt Tween®-Detergentien, insbesondere Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat (Tween® 40).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des erfindungsgemäß verwendeten Extraktionspuffers sind ein oder mehrere Cholsäurederivate. Erfindungsgemäß geeignete Cholsäurederivate sind anionische Detergentien. Sie besitzen ein Steroidgrundgerüst, das eine oder mehrere gleiche oder verschiedene Seitenketten, wie z.B. -OH, -CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> oder auch beispielsweise Aminosäuren, trägt, sowie eine anionische Carboxylgruppe am Ende einer Alkylkette. Besonders geeignet sind Cholsäurederivate, die – im Gegensatz zu nicht-ionischen Detergentien wie Triton – eine niedrige Aggregatzahl besitzen. Als Cholsäurederivate gelten erfindungsgemäß auch Cholsäure selbst sowie Salze der Cholsäure. Bevorzugt wird als Cholsäurederivat Na-Deoxycholat eingesetzt.

In dem erfindungsgemäß in Schritt c) eingesetzten Extraktionspuffer werden ein oder mehrere Cholsäurederivate in einem Anteil von typischerweise insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent, bevorzugt 0,1 bis 2,5 Massen% verwendet. Auch hier kann eine Erhöhung des Anteils über den angegebenen Bereich eine Denaturierung der Proteine und/oder eine Störung der weiteren Analysen bewirken.

- 16 -

- Weiterhin enthält der Extraktionspuffer ein oder mehrere Alkalimetall- und/oder Ammoniumsalze in einer Konzentration zwischen 75 und 500 mMol/l. Eine Erhöhung der Salzkonzentration über den angegebenen Konzentrationsbereich kann eine Denaturierung der Proteine und/oder eine
- 5 Störung der weiteren Analysen bewirken.
- Erfindungsgemäß bevorzugt werden Alkalimetallsalze, insbesondere Natrium-Salze, wie Nitrate, Sulfate, Phosphate und besonders Halogenide, wie Bromide oder Chloride. Besonders bevorzugt ist NaCl.
- 10 Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugter Extraktionspuffer für Schritt c) enthält ca. 10 mM PIPES, ca. 1 Massen% Tween® 40, ca. 0,5 Massen% Deoxycholat und ca. 350 mM NaCl.
- Zusätzlich kann der Extraktionspuffer für Schritt c) weitere Bestandteile, wie z.B. Stabilisatoren oder Konservierungsmittel enthalten.
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens enthält der Extraktionspuffer für Schritt c) zusätzlich eine Nuklease, bevorzugt eine Endonuklease aus *Serratia marcescens* (Benzonase® der Firma Merck KGaA, Darmstadt). Für die Aktivität der Nukleasen ist es zumeist
- 20 vorteilhaft, dem Extraktionspuffer zusätzlich Erdalkalimetallsalze, typischerweise in einer Konzentration zwischen 0,02 und 10 mMol/l, zuzusetzen. Besonders geeignete Salze und deren Konzentration sind je nach der verwendeten Nuklease zu wählen. Beim Einsatz von Benzonase®
- 25 ist beispielsweise  $MgCl_2$  in einer Konzentration zwischen 1 und 10 mM, insbesondere zwischen 1 und 2 mM geeignet.
- Die geeignete Menge bzw. Aktivität der eingesetzten Nuklease richtet sich nach der angestrebten Dauer des Extraktionsschrittes. Je mehr Nuklease zugesetzt wird, desto schneller kann die Extraktion durchgeführt werden.
- 30 Dabei ist jedoch zu bedenken, dass das bei der Extraktion erhaltene Partialproteom auch mit der Nuklease verunreinigt ist. Je mehr Nuklease

- 17 -

eingesetzt wird, desto mehr Nuklease ist auch in dem Partialproteom enthalten.

Es ist zu beachten, dass Nukleasen bestimmte Verfahren der Proteinanalyse, wie z.B. EMSA, stören. Soll das Nukleoplasma-  
5 Partialproteom einem solchen Analyseverfahren zugeführt werden, muß auf den Zusatz von Nukleasen verzichtet werden.

Wie aus Beispiel 4 und 5 ersichtlich wird, kann durch den Zusatz von Nuklease beeinflusst werden, ob eher schwach gebundene oder stark  
10 gebundene Proteine des Zellkerninneren bevorzugt extrahiert werden. Wird dem Puffer keine Nuklease zugesetzt, so reduziert sich der Anteil der stark Nukleinsäure-gebundenen Proteine, wie der Histone.

Die Integrität des Cytoskeletts wird durch den erfindungsgemäßen  
15 Verfahrensschritt c) zur Erstellung eines Partialproteoms der Proteine des Zellkerninneren nicht signifikant beeinträchtigt, so dass durch das erfindungsgemäße Verfahren erstmals eine von den hoch-abundanten Komponenten des Cytoskeletts getrennte, in den niedrig-abundanten nukleären Proteinen angereicherte Fraktion erhalten werden kann.

20  
Zusätzlich können im Anschluß an Schritt c) in einem nachfolgenden Extraktionsschritt aus dem verbleibenden Extraktionsrückstand nach bekannten Methoden die Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der Kernmatrix als weiteres Partialproteom extrahiert werden. Geeignet  
25 sind dafür z.B. SDS-haltige denaturierende Puffer. Diese Puffer können zusätzlich reduzierende Agenzien wie z. B. DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol enthalten.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfach, effizient und automatisierbar und vereinfacht die Detektion und Analyse der niedrig-abundanten und gleichzeitig pharmakologisch interessantesten regulatorischen Proteinklassen (Membranproteine wie z.B. Plasmamembranständige

- 18 -

Rezeptoren oder DNA-assoziierte Proteine und Transkriptionsfaktoren) wesentlich. Dies wird durch einfache und selektive Abtrennung von hoch-abundanten Proteinen (z.B. Haushaltsproteine im Cytosol als auch Cytoskelettproteine) erreicht. Das Verfahren erlaubt erstmals die getrennte  
5 Betrachtung funktioneller Proteine von Zellkern und Cytoskelett ohne den Verlust anderer Partialproteome. Die erhaltene Partialproteome können einer Vielzahl von etablierten Proteinanalyse-Techniken zugeführt werden. Dies erlaubt z.B. auch Funktionsuntersuchungen mittels Enzym Aktivitätssays, oder *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) für  
10 Zellkernproteine. Außerdem ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur die topologische Zuordnung zellulärer Proteinen, sondern auch die Analyse der dynamischen Umverteilung der genannten Proteinklassen in den verschiedenen zellulären Kompartimenten inklusive des Zellkerns, was durch bisherige Ansätze nicht möglich war. Eine solche Analyse ergibt  
15 wichtige Information über die Funktion des untersuchten Proteins. Verknüpft mit gängigen Techniken wie z.B. der Massenspektrometrie (MS), 2D-Gelelektrophorese (2DE), Aminosäure-Sequenzierung oder Immunoblotting kann die umfassende Analyse der in der Zelle vorhandenen Proteine und deren subzellulärer Verteilung eingesetzt werden, um neue  
20 Proteine oder Proteinfunktionen zu identifizieren und auf deren Beteiligung in bestimmten zellulären Signalwegen hinzuweisen. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt somit einen grundlegenden Ansatz dar, um sowohl physiologische als auch pathophysiologische zelluläre Vorgänge oder Veränderungen zu charakterisieren, welche sich u.a. durch Krankheiten  
25 oder unter Einfluss von Medikamenten/Substanzen ergeben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit für die Proteinextraktion, insbesondere für die Erstellung von Partialproteomen aus einem in einer Zellpräparation enthaltenen Gesamtproteom, zumindest  
30 enthaltend einen Extraktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8, der zumindest die folgenden Bestandteile enthält:

- 19 -

- Insgesamt 0,1 bis 7 Massenprozent eines oder mehrerer nicht ionischer Detergentien
- Insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent eines oder mehrerer Cholsäurederivate
- 5 - eines oder mehrere Salze aus der Gruppe der Ammonium- und/oder Alkalimetallsalze in einer Gesamtkonzentration zwischen 75 und 500 mMol/l.

Die für den Extraktionspuffer für Schritt c) angegebenen bevorzugten Mengen der einzelnen Bestandteile gelten ebenso für den Extraktionspuffer des Kits. Der Puffer liegt typischerweise als trockene Reagenzienmischung zum Auflösen in Wasser, als wässriges Konzentrat oder zum direkten Einsatz in wässriger Form vor.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit weiterhin eine Nuklease zum Zusatz zu dem Extraktionspuffer.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit zusätzlich Puffer zur Extraktion der cytosolischen Proteine und/oder der Membran/Organelle-Proteine aus Zellpräparaten. Besonders bevorzugt enthält der Kit Reagenzien zur Durchführung der bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der aus dem Gesamtproteom einer Zellpräparation vier Partialproteome (Partialproteom angereichert mit cytosolischen Proteinen, Partialproteom angereichert mit Membran/Organelle-Proteinen, Partialproteom angereichert mit Proteinen des Zellkerninneren, Partialproteom angereichert mit Proteinen des Cytoskeletts und der Kernmatrix) erhalten werden.

Genauso kann der Kit weitere Bestandteile bzw. Reagenzien aufweisen, wie zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Geräte und Verbrauchsgegenstände und/oder Reagenzien zur weiteren Bearbeitung der Partialproteome, z.B. für die funktionelle Analyse oder Lagerung.

- 20 -

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

#### Literaturverzeichnis

- [1] Ramsby et al (1994): „Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes“ *Electrophoresis* 15(2) 265-77
- [2] Ramsby et al (1999): „Differential detergent fractionation of eukaryotic cells“ in *Methods in Molecular Biology, Volume 112: „2-D proteome Analysis Protocols“* Andrew J. Link (Editor, Humana Press Totowa, New Jersey, 1999
- [3] Patton W.F. (1999): „Protein subcellular redistribution: linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies“ *J. Chrom B*, 722, 203-223
- [4] Chiang et al. (2000): „NFkappaB translocation in human microvessel endothelial cells using a four-compartment subcellular protein redistribution assay“ *J. Biochem. Biophys Meth.* 46 53-68
- [5] Jimi et al. (1998): „Activation of NFkappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1“ *J. Biol. Chem* 273, 8799-805
- [6] Mejdoubi et al. (1999): „NFkappaB is involved in the induction of the rat hepatic alpha-1acid glycoprotein gene by phenobarbital“ *Biochem Biophys Res. Commun.* 254, 93-9
- [7] Butcher et al (2001): „Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing

nuclear translocation of the transcription factor NFkappaB" *J. Immun.*  
167(4), 2193-201".

5

# Abkürzungsverzeichnis

10

15

20

25

30

μ	Mikro
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A431	Epithelkarzinomzellen
Bes	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
CHO	chinese hamster ovary
CMC	Kritische Micellare Konzentration
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
F1	Fraktion 1, angereicherte cytosolische Proteine
F2	Fraktion 2, angereicherte Membran/Organellen Proteine
F3	Fraktion 3, angereicherte Kernproteine
F4	Fraktion 4, angereicherte Cytoskelettproteine
H1, H2,...,H4	Histon1, Histon2, ..., Histon4
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-



- 22 -

5

10

15

20

25

30

	ethansulfonsäure
HLB-Wert	Hydrophile/Hydrophobe-Balance
HMG	High Motility Group
HSP70	Hitze-Schock-Proteine 70 kDa
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KDa, kD	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MCF7	Mammakarzinomzellen
Mes	2-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Mio	Millionen
mMol/l	millimol pro Liter
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
Mopso	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mV	Milli Volt
MW	Molecular Weight
NaCl	Natriumchlorid
Na-DOC	Natrium-deoxycholat
NP-40	Polyethylenglycol-p-isooctylphenylether
pl	Isoelektrische Punkt

- 23 -

	PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethansulfonic acid)
	RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
	RT	Raumtemperatur
5	SAOS 2	Osteosarkomzellen
	SDS	Sodiumdodecylsulfat
	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
10	T <sub>25</sub> - Kulturflasche	Kulturflasche mit 25 cm <sup>2</sup> Fläche
	T <sub>75</sub> - Kulturflasche	Kulturflasche mit 75 cm <sup>2</sup> Fläche
15	Tris	2 - Amino - 2 - (hydroxymethyl) - 1,3 - propandiol
	Triton® X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
	Tween® 40	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
	U	Unite
20	ON	über Nacht
	V	Volt
	v/v	Volume/Volume
	w/v	weight/Volume
	w/v	weight/volume
25	WB	Western-Blotting

30

- 24 -

## Beispiele

### 1. Untersuchung des Proteinmusters mittels SDS-PAGE von Extrakten nach selektiver Detergenz-Extraktion von eukaryontischen Zellen nach dem Stand der Technik [1, 2, 3].

Das Ausgangsmaterial für diesem Versuch waren Mammakarzinomzellen (MCF7), die zu 80% konfluent als adhärenente Monolayer Zellen vorlagen. Die Durchführung der Extraktionsschritte fand nach dem Stand der Technik statt. Auf diese Weise entstanden die Proteinextrakte F1-F4. Diese Proteinextrakte wurden volumenequivalent in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt, mit Coomassie-Brilliant-Blue detektiert und zum Schluß ausgewertet. Ein solches Beispiel zeigt die Abbildung 1.

In Abbildung 1 werden folgende Bezeichnungen verwendet:  
M=Marker. F1 bezeichnet die Fraktion 1 mit den cytosolischen Proteinen. F2 steht für Fraktion 2 und stellt die Membran/Organellen-Proteine dar. F3 demonstriert die im Stand der Technik [1, 2, 3] als 'nukleäre' Fraktion bezeichnete Fraktion 3 und F4 kennzeichnet Fraktion 4, die nach dem Stand der Technik die Proteine des Cytoskeletts und der Kernmatrix enthalten soll.

Auffällig an den bei der Reproduktion des Standes der Technik erhaltenen Ergebnissen (s. Abbildung 1) ist der im Vergleich zu den Fraktionen 1, 2 und 4 sehr geringe Proteingehalt der 'nukleären' Fraktion 3. Weiterhin finden sich die typischen Bandenmuster der DNA-assoziierten Histonproteine (die zur Gruppe der Proteine des Zellkerninneren gehören), in Fraktion 4, zusammen mit den Proteinen des Cytoskeletts. Die typischen Bandenmuster der DNA-assoziierten Histonproteine sind in Abbildung 1 mit einem \* gekennzeichnet.

Dieses Ergebnis unterstützt die Feststellung der Tatsache, dass die in der Literatur [1, 2, 3] beschriebene Methode zur Herstellung von vier

- 25 -

Partialproteomen kein Partialproteom liefert, in dem die Proteine des Zellkerninneren deutlich getrennt von den Proteinen des Cytoskeletts angereichert sind. Die nach dem Stand der Technik erhältliche Fraktion 3 ist nicht angereichert mit den Proteinen des Zellkerninneren. Diese finden  
5 sich vielmehr größtenteils in Fraktion 4, in der zum einen die Proteine nur denaturiert erhalten werden und zum anderen die Proteine des Cytoskeletts extrahiert werden.

2. Immunoblotting-Untersuchung der topologischen Zuordnung von  
10 Markerproteinen in Extrakten nach selektiver Detergenz-Extraktion von eukaryontischen Zellen nach dem Stand der Technik [1, 2, 3]

Die entsprechend Beispiel 1 gewonnenen Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf einer PVDF-Membran geblottet und mit ausgesuchten Markerproteine untersucht.

15 In Abbildung 2 werden die Markerproteine des Cytosols (a-b) und der Membranen/Organellen (b-d) in den entsprechenden Fraktionen (F1 bis F4) detektiert. Der Transkriptionsfaktor c-jun (e) sowie das DNA-assoziierte Protein Histon 1 (f) (beides Proteine des Zellkerninneren) werden jedoch  
20 nicht in der 'nukleären' Fraktion F3 detektiert, sondern werden erst in der letzten Fraktion (F4) gemeinsam mit dem hoch-abundanten Cytoskelettmarker Cytokeratin (g) unter denaturierende Bedingungen extrahiert. a: Calpain; b: HSP 70; c: Pan-Cadherin; d: Cytochrome P 450 reductase; e: c-jun; f: Histone; g: Cytokeratin

25 Die Immunoblotanalyse der erhaltenen Fraktionen für repräsentative Markerproteine nach Detergenz-Extraktion nach dem Stand der Technik demonstriert, dass keine eigenständige Fraktion für die löslichen und DNA-assoziierten Proteine des Zellkerninneren erhalten wird. Vielmehr werden  
30 diese unter denaturierenden Bedingungen zusammen mit Proteinen des Cytoskeletts solubilisiert. Somit ist mit der Methode nach dem Stand der

Technik z.B. eine eindeutige Analyse der topologischen Umverteilung der Proteine des Zellkerninneren nicht möglich.

### 3. Beispielhafte Darstellung der selektiven Detergenz-Extraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren

Die Extraktionspuffer wurden laut Tabelle unter 3.a angesetzt. Die Durchführung der Extraktion ist unter 3b ausführlich beschrieben. Die Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den folgenden Beispielen näher beschrieben.

#### a. Pufferzusammensetzung, welche für das 3.b dokumentierte Experiment verwendet wurde

Extraktionspuffer	Bestandteile	Konzentration
EXTRAKTIONSPUFFER I pH 8,8	PIPES	10 mM
	Digitonin	0,02%
	Saccharose	300 mM
	Natriumchlorid	15 mM
	EDTA	0,5 mM
EXTRAKTIONSPUFFER II pH 7,4	PIPES	10 mM
	Triton X-100	0,50%
	Saccharose	300 mM
	Natriumchlorid	15 mM
	EDTA	0,5 mM
EXTRAKTIONSPUFFER III pH 7,4	PIPES	10 mM
	Tween-40	1,0%
	Deoxycholat	0,5%
	Natriumchlorid	350 mM
	Magnesiumchlorid	1 mM
	Benzonase	500 U/ml
EXTRAKTIONSPUFFER IV pH 7,4	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5%
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM

#### b. Beispielhafte Durchführung der Extraktion adhärenter Zellen

Die subzelluläre Fraktionierung wurde mit Gewebekulturzellen in T<sub>25</sub>-Gewebekulturschalen durchgeführt. Bei der Verwendung anderer

- 27 -

Kulturgefäße können die Puffermengen entsprechend maßstabsgerecht an die Fläche der verwendeten Platte angepaßt werden. Für die Extraktion müssen vitale Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bei etwa 80 % Konfluenz eingesetzt werden. In diesem Beispiel sind SAOS 2-Zellen verwendet worden.

5

1. Die Extraktionspuffer I, II und III auf Eis, die Extraktionspuffer IV und den Protease Inhibitor Cocktail bei RT auftauen.
2. Die Gewebekulturschale leicht ankippen, so dass das Medium aus der Kulturf Flasche entnommen werden kann, ohne den Zellrasen zu berühren. Medienreste sorgfältig entfernen.
3. Die Gewebekulturschale leicht ankippen. Vom Rand her 2 ml eiskalten Waschpuffer vorsichtig zupipettieren und den Zellrasen damit überschichten. Die Kulturschale für 5 min unter sanftem Schütteln bei 4°C inkubieren.
4. Die Gewebekulturschale leicht ankippen und den Waschpuffer sorgfältig entfernen, ohne den Zellrasen zu berühren.
5. Schritte 3 und 4 wiederholen, um Mediumbestandteile wie z. B. BSA, Aminosäuren und Indikatorfarbstoffe vollständig zu entfernen.
6. 1 ml eiskalten Extraktionspuffer I und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail miteinander vermischen. Vorsichtig vom Rand her auf die gewaschene Gewebekulturschale pipettieren, ohne den Zellrasen zu berühren. Die Zellen vorsichtig mit dem Puffer überschichten. Unter sanftem Schütteln für 10 min bei + 4° C inkubieren.
7. Die Gewebekulturschale vorsichtig ankippen. Die cytosolischen Proteinextrakte (Fraktion 1) vorsichtig aus der Kulturf Flasche entnehmen, ohne den Zellrasen zu berühren, und bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis inkubieren. Zur langfristigeren Lagerung in geeigneten Mengen (z. B. 100 µl) aliquotieren und bei -80° C aufbewahren.
8. 1 ml eiskalten Extraktionspuffer II und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail miteinander vermischen. Vorsichtig vom Rand her auf die

- 28 -

Gewebekulturschale pipettieren ohne den Zellrasen zu berühren. Die Zellen vorsichtig mit dem Puffer überschichten danach 30 min bei leichtem Schütteln und +4° C inkubieren

- 5 9. Die Gewebekulturschale vorsichtig kippen. Den Extrakt mit den Membran/Organellen-Proteinen (Fraktion 2) vorsichtig aus der Kulturflasche entnehmen, ohne den Zellrasen zu berühren, und bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis inkubieren. Zur langfristigeren Lagerung in geeigneten Mengen aliquotieren und bei -80° C aufbewahren.
- 10 10. 500 µl eiskalten Extraktionspuffer III mit 5 µl Protease Inhibitor Cocktail und 10 µl (250 U) Benzonase® miteinander vermischen und vorsichtig auf die restlichen Zellbestandteile pipettieren. Unter sanftem Schütteln für 10 min bei 4°C inkubieren.
- 15 11. Die Gewebekulturflasche vorsichtig kippen. Den Proteinextrakt mit den nukleären Proteinen (Fraktion 3) vorsichtig aus der Kulturflasche entnehmen, ohne den Zellrasen zu berühren, und bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis inkubieren. Zur langfristigeren Lagerung in geeigneten Mengen aliquotieren und bei -80° C aufbewahren.
- 20 12. 500 µl auf Raumtemperatur temperierten Extraktionspuffer IV und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail miteinander vermischen und auf den restlichen Zellrasen gegeben. Die Zellschicht löst sich bei der Zugabe dieses Puffers von der Platte ab.
- 25 13. Durch Hinauf- und Hinunterpipettieren mit einer 1 ml-Pipettenspitze (z. B. Eppendorf) suspendieren. Nach vollständigem Lösen der restlichen Zellbestandteile in ein Mikrozentrifugenröhrchen transferieren und bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis inkubieren. Fraktion 4 enthält Cytoskelettproteine. Zur langfristigeren Lagerung in geeigneten Mengen aliquotieren und bei -80° C aufbewahren.

30

#### 4. morphologische Darstellung der Zellen bei der erfindungsgemäßen Durchführung der selektiven Detergenz-Extraktion

- 29 -

Analog zu Beispiel 3 wurde die Proteinextraktion einer T<sub>75</sub>-Kulturflasche zu 80% konfluent bewachsen mit SAOS 2-Zellen durchgeführt. Diese wurden vor der Extraktion, d.h. unbehandelt (Bild i), und schrittweise nach der  
5 jeweiligen selektiven Detergenz-Extraktion (Bild ii-iv) auf verfahrensbedingte morphologische Veränderung mit Hilfe eines Mikroskops untersucht.

Abbildung 3 zeigt ein solches Beispiel. Nach der Behandlung der Zellen mit  
10 Extraktionspuffer I (Bild ii), treten die cytosolischen Inhalte der Zellen aus, wobei die Zellen schrumpfen. Die Integrität der Zellkerne und Plasmamembran bleibt weitestgehend erhalten. Nach der Inkubation der Zellen mit dem Extraktionspuffer II (Bild iii) werden die  
15 Membran/Organellen-Proteine extrahiert, wobei die Integrität der Zellkerne immer noch erhalten bleibt. Nach der Inkubation des restlichen Zellmaterials mit dem Extraktionspuffer III (erfindungsgemäßer Verfahrensschritt c)) (Bild iv) wird die Fraktion der Proteine des Zellkerninneren extrahiert. Das restliche Zellmaterial wird im  
20 Extraktionspuffer IV aufgenommen. Man erhält eine Fraktion, in der die Cytoskelettbestandteile enthalten sind.

P I: Extraktionspuffer I

P II: Extraktionspuffer II

P III: Extraktionspuffer III

25 P IV: Extraktionspuffer IV

i: SAOS2- Zellen unbehandelt

ii: SAOS2-Zellen mit Puffer I behandelt, nach Inkubation erhält man Fraktion 1 (F1)

30 iii: SAOS2-Zellen mit Puffer II behandelt, nach Inkubation erhält man Fraktion 2 (F2)



- 30 -

iv: SAOS2-Zellen mit Puffer III behandelt, nach Inkubation erhält man Fraktion 3 (F3)

5 **5. Proteinverteilung in Extrakten nach selektiver Detergenz-Extraktion von eukaryontischen Zellen nach dem Stand der Technik [1, 2, 3] im Vergleich zur der erfindungsgemäßen Methode.**

10 Um die Effizienz der Salzkonzentrationserhöhung in Puffer III überprüfen zu können, wurde die Puffer III mit variierenden Salzkonzentrationen (Stand der Technik, 15 mM NaCl + Benzonase, 150 mM NaCl + Benzonase® und 350 mM NaCl + Benzonase®) angesetzt. Die Benzonase® (unspezifische Endonuklease) wurde bei allen Versuchen in gleicher Konzentration eingesetzt. Alle anderen Parameter entsprechen den im Stand der Technik angegebenen.

15 Als biologisches Material wurden 4 mal ca. 80% konfluente T<sub>75</sub>-SAOS 2-Zellen eingesetzt. Die entstandenen Proteinextrakte wurden mittels Proteinbestimmungsmethode, welche auf Lowry-Assay basiert, untersucht und ausgewertet.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren deutet auf eine effizientere Extraktion des Zellkerns hin. Dies wird durch eine signifikante Erhöhung des Proteingehalts der nukleären Fraktion (F3) und eine Abnahme der Proteinmenge in der Cytoskelett-Fraktion (F4) deutlich sichtbar.

25 Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Proteinbestimmung und deren Verteilung auf die vier Fraktionen.

Durch die Erhöhung der Salzkonzentration in Puffer III kann im Zusammenhang mit der Wirkung von Benzonase® eine Umverteilung von Proteinen aus Fraktion 4 (F4) in Fraktion 3 (F3) erreicht werden. In den Fraktionen F1 und F2 wird erwartungsgemäß keine signifikante Veränderung beobachtet.

30 a. Stand der Technik

- b. 15 mM NaCl in Puffer III + Benzonase (Stand der Technik + Benzonase)
- c. 150 mM NaCl in Puffer III + Benzonase
- d. 350 mM NaCl in Puffer III + Benzonase

5

#### 6. Untersuchungen zur Wirkung des erfindungsgemäßen Extraktionspuffers (Puffer III) mit und ohne Zusatz einer Nuklease

Die Proteinextrakte aus Beispiel 5 wurden ebenfalls mittels immunologischer Methoden untersucht, d.h. sie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und auf eine PVDF-Membran geblottet.

Die in Abbildung 5 dargestellte Analyse demonstriert die Verteilung von Transkriptionsfaktoren (am Beispiel c-jun Abbildung 5A) und DNA-assoziierten Proteinen (am Beispiel Histon 1 Abbildung 5B) in Fraktionen nach selektiver Detergenz-Extraktion in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration und der Einwirkung einer Nuklease, ohne dabei die Integrität vom Cytoskelett signifikant zu beeinträchtigen.

Um die Wirkung der Benzonase® zu testen, wurde in Gegenwart von 350 mM NaCl in Extraktionspuffer III, mit und ohne Nukleasewirkung in Fraktion 3, das Verhalten der Transkriptionsfaktoren und Histonproteine untersucht (Abbildung 5C). Der Einsatz der Nuklease bei gleich bleibender NaCl-Konzentration ermöglicht eine eindeutig erhöhte Wiederfindungsrate der DNA-assoziierten Histon-Proteine in der Fraktion 3, wohingegen die Transkriptionsfaktoren in Gegenwart von 350 mM NaCl ohne Nukleasewirkung extrahiert werden können.

Detaillierte Beschreibung der Abbildung 5:

5A) Die Wiederfindungsrate des Transkriptionsfaktors c-jun in Fraktion 3 ist abhängig von der NaCl-Konzentration in Puffer 3. Ab einer Konzentration von 150 mM NaCl in Puffer 3 kann c-jun in der Fraktion 3 detektiert werden (I: c-jun/15 mM NaCl; II: c-jun/150mM NaCl; III c-jun/350 NaCl). Keine dieser Bedingungen beeinträchtigt die Integrität des Cytoskeletts, was

- 32 -

durch die ausschließliche Detektion von Cytokeratin in Fraktion 4 dokumentiert ist (IV: Cytokeratin/350 mM NaCl). Bei allen Experimenten wurde Benzonase<sup>®</sup> eingesetzt. Bei Extraktion gemäß dem Protokoll des Standes der Technik [1, 2, 3] wird c-jun in der vierten Fraktion detektiert (I).

5

**5B)** Das Verhalten von Histon 1 bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen in Puffer 3. Das DNA-assoziierte Histon 1 wurde erst bei 350 mM NaCl in Puffer 3 und gleichzeitiger Nuklease-Wirkung in Fraktion 3 detektiert (I: Histon 1/15 mM NaCl; II: Histon 1/150mM NaCl; III: Histon 1/350 NaCl)

10

**5C)** In Gegenwart von 350 mM NaCl in Extraktionspuffer 3 wird c-jun unabhängig von der Nukleasewirkung in Fraktion 3 detektiert. (I: c-jun/Puffer 3 mit Benzonase; II: c-jun/Puffer 3 ohne Benzonase). Histone 1 hingegen bedarf der gleichzeitigen Einwirkung von Nuklease, um zusammen mit c-jun in Fraktion 3 detektiert zu werden (III: Histone/Puffer 3 mit Benzonase; IV: Histone/Puffer 3 ohne Benzonase). Der Einsatz der Nuklease bei gleich bleibender NaCl-Konzentration ermöglicht eine eindeutig erhöhte Wiederfindungsrate DNA-assoziiierter Proteine in der Fraktion 3.

15

20

#### **7. Proteinmuster von Extrakten und topologische Zuordnung von subzellulären Markerproteinen nach selektiver Detergenzextraktion von eukaryontischen Zellen nach erfindungsgemäßen Extraktionsverfahren**

25

Die Proteinextrakte, die anhand Punkt 3a und 3b gewonnen wurden, wurden mittels SDS-PAGE (10% Tricine-PAA-Gel) aufgetrennt. Die Proteinextrakte wurden anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue detektiert. Ein solches Ergebnis ist in Abbildung 6A zu sehen.

30

Die Proteinextrakte aus 6A wurden geblottet und mit ausgesuchten Markerproteinen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6B zu sehen.

- In Übereinstimmung mit der Proteinmengenbestimmung in Beispiel 4 kann hier (6A und 6B) demonstriert werden, dass die effiziente Freisetzung der DNA-assoziierten Proteine des Zellkerninneren unter geringfügig denaturierenden Bedingungen ermöglicht wird, ohne dabei die Integrität des Cytoskeletts zu beeinträchtigen. Die eigenständige Fraktion der Proteine des Zellkerninneren erlaubt somit die getrennte Betrachtung funktioneller Proteine von Zellkern und Cytoskelett ohne den Verlust anderer Partialproteome.
- 10 Detaillierte Beschreibung der Abbildung 6:
- 6A) Nach selektiver Detergenz-Extraktion eukaryontischer Zellen anhand der erfindungsgemäßen Methode können eindeutig verschiedene Proteinmuster der eigenständigen subzellulären Fraktionen beobachtet werden. Hierbei bezeichnet F1 die Fraktion 1 mit den cytosolischen Proteinen. F2 steht für Fraktion 2 und stellt die Membran/Organelle dar. F3 (Fraktion 3) entspricht den Proteinen des Zellkerninneren. F4 (Fraktion 4) schließlich repräsentiert die Proteine des Cytoskeletts und der Kernmatrix. Im Vergleich zur Extraktion nach dem Stand der Technik [1, 2, 3] (Abb. 2) werden deutlich mehr Proteine in Fraktion 3 detektiert.
- 20 6B) Verteilung von Markerproteinen auf subzelluläre Fraktionen nach selektiver Detergenz-Extraktion.
- Nach selektiver Detergenz-Extraktion von eukaryontischen Zellen anhand der erfindungsgemäßen Methode ist im Gegensatz zum Stand der Technik (Abb. 3) eine eindeutige topologische Zuordnung von nukleären Markerproteinen möglich. Markerproteine des Cytosols und der Membranen/Organelle werden in den entsprechenden Fraktionen detektiert (a-c). Lösliche Transkriptionsfaktoren (d und e) sowie das DNA-assoziierte Protein Histon 1 (f) werden eindeutig in einer Fraktion der Proteine des Zellkerninneren angereichert. Erst im letzten Schritt wird getrennt hiervon der hoch-abundante Cytoskelettmarker Cytokeratin (g) extrahiert.

- 34 -

a: Calpain; b: Pan-Cadherin; c: Cytochrome P 450 reductase; d: c-fos; e: c-jun; f: Histone;  
g: Cytokeratin

5       **8. Untersuchung der dynamischen subzellulären Redistribution von NFkappaB, welcher an der Signaltransduktion beteiligt ist und nach zellulärer Stimulierung mit TNFalpha vom Cytosol in den Zellkern transloziert wird.**

10       A431 Zellen wurden unterschiedlich lang (0, 5 und 15 Minuten) mit TNF $\alpha$  stimuliert und entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren (siehe Beispiel 3) extrahiert. Die cytosolische Fraktion (F1), die Membran/Organell-Fraktion (F2), die nukleare Fraktion (Fraktion der Proteine des Zellkerninneren) (F3) wie auch die Cytoskelett-Fraktion (F4)  
15       wurden für den jeweiligen Stimulierungszeitpunkt mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen NFkappaB durchgeführt. Die Zeitverlaufsanalyse demonstriert eine eindeutige NFkappaB-Umverteilung vom Cytosol in den Zellkern.

20       Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich, um die dynamischen subzellulären Redistribution von NFkappaB, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist und nach zelluläre Stimullierung mit TNFalpha vom Cytosol im Zellkern transloziert wird, einfach und direkt  
25       mittels Immunoblot zu analysieren.

**9. Die Fraktion der Proteine des Zellkerninneren enthält funktionelle, hinsichtlich DNA-Bindung aktive Transkriptionsfaktoren.**

30       CHO-K1 Zellen wurden nach dem erfindungsgemäßen Extraktionsverfahren (gemäß Beispiel 3) extrahiert, jedoch ohne Benzonase®-Zusatz im Extraktionspuffer III (Abbildung 8A). Ebenfalls

- 35 -

wurde nach einem Standardverfahren für die spezielle Herstellung von nuklearen Extrakten (Dignam, et al.: Nucleic-Acids-Research 11(5) (1983) 1475-89) gewonnene Fraktion der Proteine des Zellkerninneren, die aktive Transkriptionsfaktoren enthält, als Positivkontrolle (Abbildung 8B) eingesetzt. Anschließend wurden Proben der erhaltenen nuklearen Fraktionen mittels EMSA analysiert um die vorhandene Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an einem Oct1-Oligonukleotide zu bestimmen. Die Analyse demonstriert eindeutig, dass die nukleare Fraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren funktionelle, hinsichtlich DNA-Bindung aktive Transkriptionsfaktoren enthält. Dies ist eine beispielhafte Demonstration der breiten Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beschreibung der Abbildung 8:

1. mit erfindungsgemäß erhaltener Fraktion der Proteine des Zellkerninneren
2. mit erfindungsgemäß erhaltener Fraktion der Proteine des Zellkerninneren + 100x nicht radioaktiv markierter Oct1-Probe
3. mit erfindungsgemäß erhaltener Fraktion der Proteine des Zellkerninneren+ 100x nicht radioaktiv markierter SP1-Probe
4. nach Standardverfahren erhaltene Fraktion der Proteine des Zellkerninneren
5. nach Standardverfahren erhaltene Fraktion der Proteine des Zellkerninneren + 100x nicht radioaktiv markiertem Oct1-Probe
6. nach Standardverfahren erhaltene Fraktion der Proteine des Zellkerninneren+ 100x nicht radioaktiv markiertem SP1-Probe

## Ansprüche

1. Verfahren zur sequentiellen Herstellung von Partialproteomen aus dem Gesamtproteom einer Zellpräparation, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
- 5 a) Bereitstellen einer Probe enthaltend eine Zellpräparation;
- b) Extraktion der cytosolischen Proteine und der Membran/Organelle-Proteine aus der in Schritt a) bereitgestellten Probe, wobei eine Zellkernpräparation zurückbleibt;
- 10 c) Extraktion der Proteine des Zellkerninneren aus der in Schritt b) erhaltenen Zellkernpräparation durch Behandlung mit einem Extraktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8, der zumindest die folgenden Bestandteile enthält:
- insgesamt 0,1 bis 7 Massenprozent eines oder mehrerer nicht
  - 15 ionischer Detergentien
  - insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent eines oder mehrerer Cholsäurederivate
  - eines oder mehrere Salze aus der Gruppe der Alkalimetall- und/oder Ammoniumsalze in einer Gesamtkonzentration zwischen 75 und 500
  - 20 mMol/l,
- wobei Detergenz-resistente Proteine des Cytoskeletts und der Kernmatrix nicht in wesentlichem Umfang zusammen mit den Proteinen des Zellkerninneren extrahiert werden, sondern im Extraktionsrückstand verbleiben.
- 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der in Schritt c) eingesetzte Extraktionspuffer zusätzlich eine Nuklease enthält.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
- 30 dass der in Schritt c) eingesetzte Extraktionspuffer Polyoxyethylensorbitanmonopamat als nicht-ionisches Detergenz, Deoxycholat als Cholsäurederivat und NaCl als Alkalimetallsalz enthält.

- 37 -

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion der cytosolischen Proteine und der Membran/Organellen-Proteine in Schritt b) erfolgt durch:

- 5        i)        Extraktion der cytosolischen Proteine aus der in Schritt a) bereitgestellten Probe durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran, ohne dabei die Integrität der subzellulären Membran/Organell Strukturen, des Zellkerns sowie des Cytoskeletts signifikant zu beeinträchtigen;
- 10       ii)       Extraktion der Membran/Organellen-Proteine aus dem in Schritt i) nach der Extraktion verbliebenen Teil der Probe unter Erhaltung der strukturellen Integrität von Zellkern und Cytoskelett.

15       5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass in einem zusätzlichen Verfahrensschritt d) aus dem in Schritt c) verbliebenen Extraktionsrückstand die Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der Kernmatrix als weiteres Partial-Proteom extrahiert werden.

20       6. Kit für die Proteinextraktion zumindestens enthaltend einen Extraktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8, der zumindest die folgenden Bestandteile enthält:

- insgesamt 0,1 bis 7 Massenprozent eines oder mehrerer nicht ionischer Detergentien
- 25       - Insgesamt 0,05 bis 3 Massenprozent eines oder mehrerer Cholsäurederivate
- eines oder mehrere Salze aus der Gruppe der Alkalimetall- und/oder Ammoniumsalze in einer Gesamtkonzentration zwischen 75 und 500 mMol/l.

30

7. Kit nach Anspruch 6 zusätzlich enthaltend eine Nuklease.



- 38 -

8. Kit nach einem der Ansprüche 6 oder 7 zusätzlich enthaltend Puffer zur Extraktion der cytosolischen Proteine und/oder der Membran/Organelle-Proteine aus Zellpräparaten sowie einen Puffer zur Extraktion der Proteine des Detergenz-resistenten Cytoskeletts und der Kernmatrix.

5

10

15

20

25

30

- 39 -

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit für die  
sequentielle Extraktion von Proteinen zur Herstellung von Partialproteomen  
5 aus einem Gesamtproteom. Insbesondere wird durch das  
erfindungsgemäße Verfahren neben anderen Partialproteomen ein  
Partialproteom von Proteinen des Zellkerninneren getrennt von Proteinen  
des Cytoskeletts und der Kernmatrix erhalten.

10

15

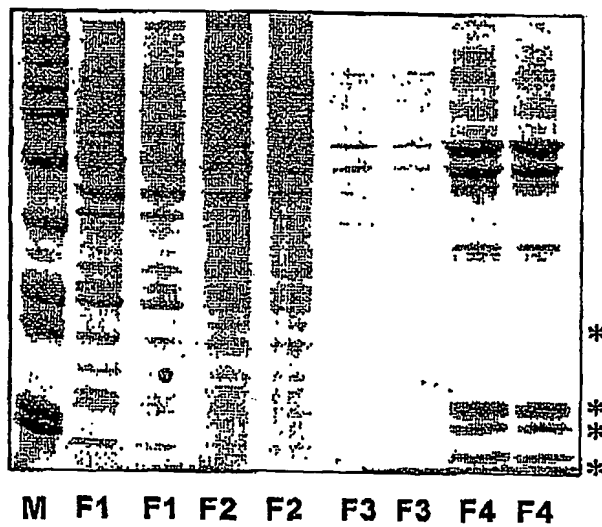
20

25

30

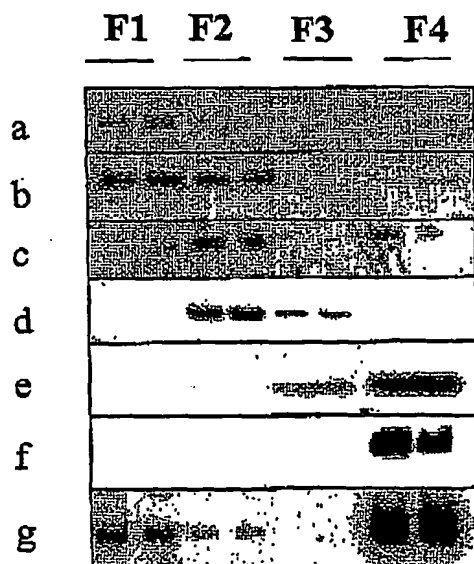
1/8

**Fig. 1**

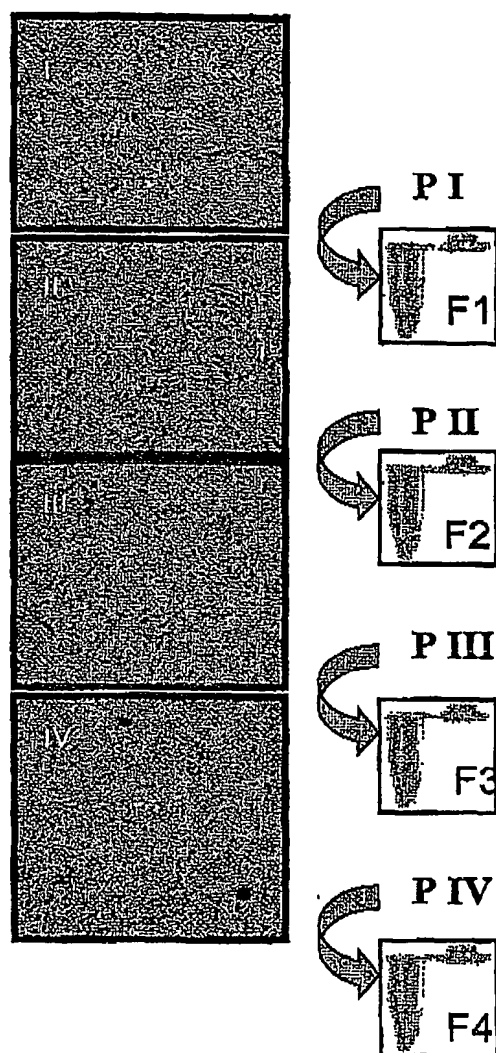


2/8

**Fig. 2**

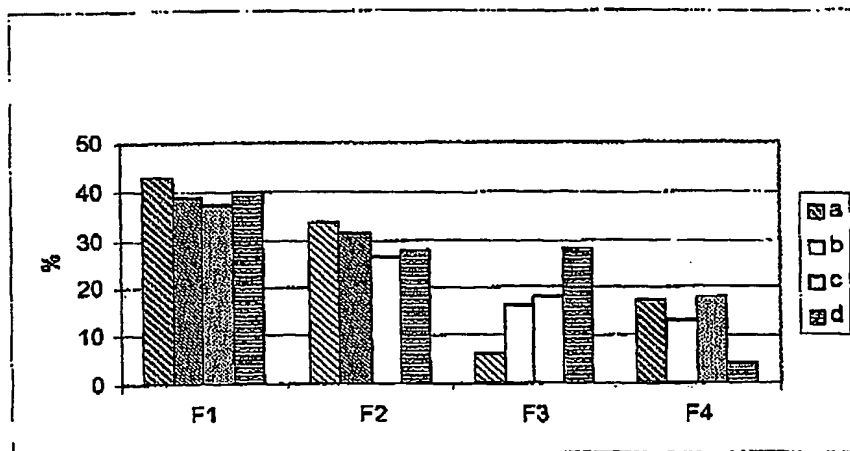


**Fig. 3**



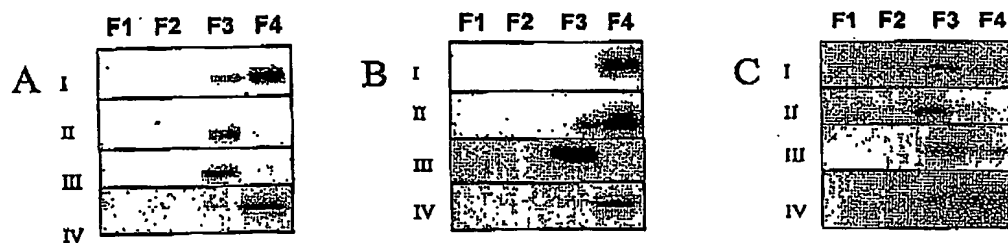
4/8

Fig. 4



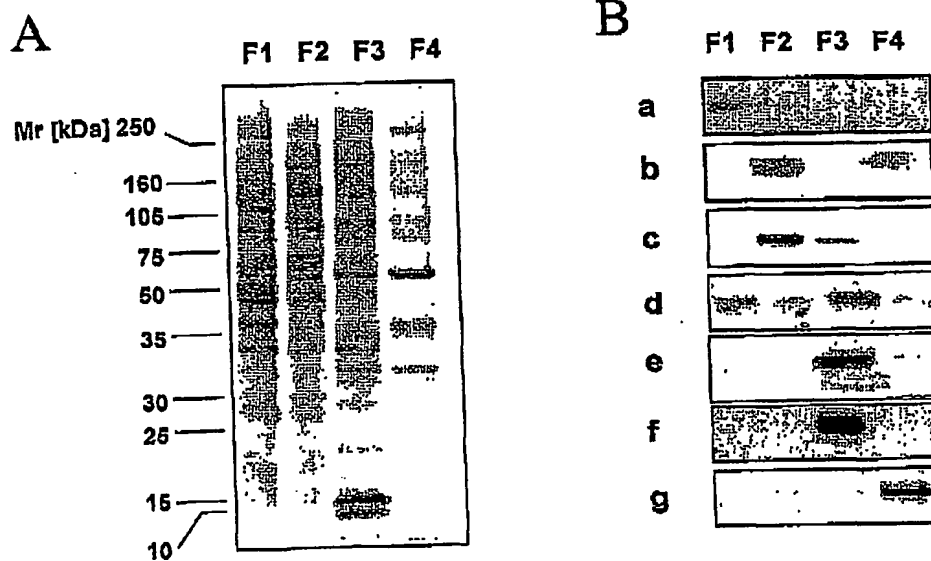
5/8

Fig. 5



6/8

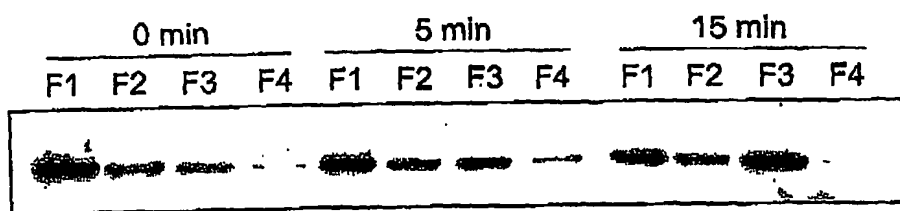
Fig. 6





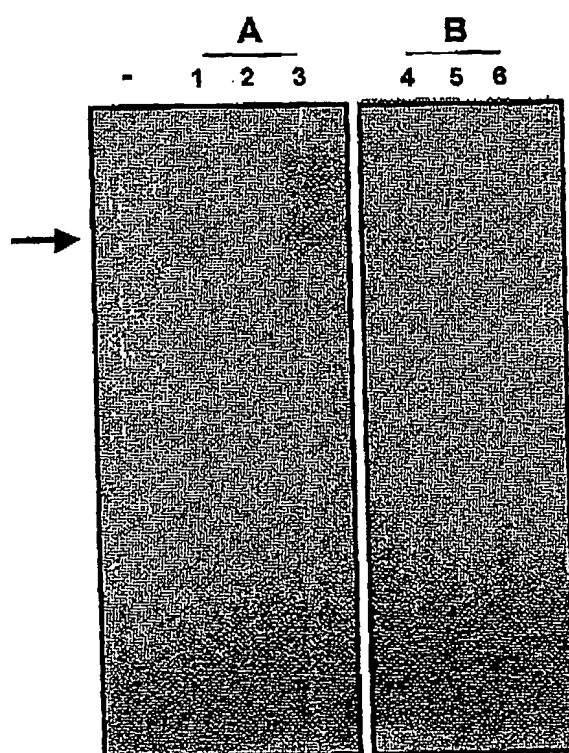
7/8

Fig. 7



8/8

Fig. 8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**